

УДК 576.895.121 : 577.152.3

© 1991

НЕКОТОРЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ГИДРОЛИЗА БЕЛКОВ НА ПИЩЕВАРИТЕЛЬНО-ТРАНСПОРТНЫХ ПОВЕРХНОСТЯХ ЦЕСТОДЫ EUVOTHRIMUM RUGOSUM И КИШЕЧНИКА ЕЕ ХОЗЯИНА — НАЛИМА**Г. И. Извекова**

Проведено сравнительное исследование активности протеиназ, функционирующих на пищеварительно-транспортных поверхностях цестоды *E. rugosum* и кишечника ее хозяина — налима. Изучены динамика их десорбции с поверхностей гельминтов и кишечника рыб и влияние значения pH и температуры инкубации среды на активность десорбированных ферментов.

В настоящее время в тегументе цестод обнаружены различные гидролитические ферменты — щелочная фосфогидролаза, аденозинтрифосфатаза, рибонуклеаза и другие (Pappas, Narcisi, 1982). Однако особенности протеолитической активности тегумента цестод изучены недостаточно. В частности, установлено, что гельминты, паразитирующие в кишечнике позвоночных животных разных классов (*E. rugosum* и *T. nodulosus* — из рыб, *D. latum* и *M. expansa* — из млекопитающих, *D. dentriticum*, *S. solidus* — из птиц), обладают различной по интенсивности протеолитической активностью (Дубовская, 1973; Еренская, 1974; Sisova-Kasatockina, Dubovskay, 1975). Самая высокая активность была обнаружена в гомогенатах цестод из птиц, самая низкая — из рыб. Проведено определение протеолитической активности в тегументе цестод *S. solidus*, поверхностные слои которого легко отделяются при мацерации (Дубовская, 1973; Шишова-Касаточкина, Дубовская, 1977). Большая протеолитическая активность обнаружена в неповрежденных гельминтах и в поверхностных слоях их тегумента, меньшая — у цестод, лишенных покровов. В присутствии живых фрагментов червей *M. expansa* наблюдалось расщепление казеина (Дубовская, 1973). Однако ранее не проводилось сравнительного исследования активности протеиназ у паразитов и их хозяев и выяснения роли процессов мембранного пищеварения в гидролизе белков у них. Для высших позвоночных животных установлено важное значение этого процесса в переваривании белковых компонентов пищи (Мембранный гидролиз. . ., 1986). Для реализации процессов мембранного пищеварения необходимы как адсорбированные, так и собственно кишечные ферменты. Первые принимают участие преимущественно в промежуточных стадиях деполимеризации нутриентов, вторые — в заключительных стадиях гидролиза, расщепляя олигомеры и димеры до уровня транспортируемых мономеров. Адсорбируемые ферменты обратимо связаны со структурами кишечной поверхности и более или менее легко могут быть освобождены.

В настоящей работе представлены результаты исследования способности цестод к гидролизу белков, а также прочности фиксации протеиназ на структурах пищеварительно-транспортных поверхностей гельминтов и кишечника их хозяев — рыб.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования — цестоды *Eubothrium rugosum* из кишечника налима, *Lota lota* (L.), а также налим из Рыбинского водохранилища. Материал собран в зимне-осенний период. Для изучения прочности фиксации протеиназ на энтероцитах кишечника рыб и у гельминтов использовали метод последовательной десорбции ферментов с отрезков кишки (Кузьмина, 1976). Исследуемые препараты (несколько особей гельминтов общей массой 1000—1500 мг или отрезок среднего отдела кишечника длиной около 2 см) помещали в пробирки с 5 мл охлажденного раствора Рингера для холоднокровных животных без глюкозы (рН 7.4), которые встряхивали в Шуттель аппарате. Затем препараты последовательно переносили в другие пробирки с раствором Рингера и повторяли встряхивание. Первую фракцию (Д₁) получали после 30-секундного встряхивания, остальные (Д₂—Д₆) — через каждые последующие 15 мин. После этого слизистую кишечника и гельминтов гомогенизировали в 5 мл раствора Рингера. Общую протеолитическую активность определяли модифицированным методом Ансона (Anson, 1938) в модификации Л. Н. Алексеенко (1968) по приросту тирозина. В качестве субстратов использовали 1%-ные растворы казеина (рН 8), сывороточного альбумина (рН 7.4), гемоглобина (рН 5 и 3), приготовленные на растворе Рингера. Скорость гидролиза субстратов выражали в мМ тирозина в 1 г ткани за 1 мин инкубации. Инкубацию ферментативно-активного препарата и субстрата осуществляли в течение 60 мин при температуре 5, 20 и 40°.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате применяемых методических подходов, позволяющих дифференцировать полостное и мембранное пищеварение и дающих количественную и качественную его оценку (Кузьмина, 1976), с пищеварительно-транспортных поверхностей кишечника налима и *E. rugosum* был получен ряд ферментативно-активных фракций. Их активность, основываясь на предложенной ранее трактовке распределения по фракциям десорбированных ферментов (Кузьмина, 1976; Кузьмина, Куперман, 1983), можно интерпретировать следующим образом. Общая протеолитическая активность фракции Д₁ (и частично Д₂) сложена из активностей ферментов, не сорбированных на поверхности исследуемых препаратов. Следующие фракции состоят из ферментов, адсорбированных в гликокаликсе и на пищеварительно-транспортных поверхностях, прочность фиксации которых увеличивается в ряду Д₁—Д₆. В гомогенатах (Г) слизистой кишечника содержатся, главным образом, только кишечные ферменты, а в гомогенатах гельминтов — протеиназы, связанные с покровами тела и ферменты, функционирующие во внутренних органах.

Во всех вариантах опытов количество фракций больше, а активность протеиназ, десорбированных с кишечника выше, чем с тегумента цестод (табл. 1, 2). Так, не считая фракции гомогената, для кишечника налима во всех случаях получено 6 ферментативно-активных фракций, а для *E. rugosum* — 2—4 в зависимости от условий опыта. Это свидетельствует о меньшей адсорбционной способности тегумента. Активность десорбированных протеиназ по отношению к субстратам возрастает в ряду альбумин—гемоглобин—казеин (табл. 2). Это отмечено как для налима, так и для *E. rugosum* во всех вариантах опытов (исключение составляет только низкая активность протеиназ при использовании субстрата гемоглобина рН 3 при температуре 5°). Основным протеолитическим ферментом в кишечнике рыб является трипсин, обладающий наибольшей активностью при рН 7—11 (Смит, 1986). Исходя из этого, можно предположить, что при использовании в качестве субстрата казеина выявляется трипсиноподобная активность, являющаяся основной у изученных животных.

Т а б л и ц а 1

Количество ферментативно-активных фракций, полученных с пищеварительно-транспортных поверхностей кишечника налима и *E. rugosum*

The number of enzyme-active fractions obtained from the digestive-absorptive surfaces of the intestine of burbot and *E. rugosum*

	Температура инкубации, °С	Казеин	Альбумин	Гемоглобин	
		pH 8	pH 7.4	pH 5	pH 3
<i>E. rugosum</i>	5	2	2	2	2
	20	3	3	2	2
	40	4	4	4	2
Налим	5	6	6	6	6
	20	6	6	6	6
	40	6	6	6	6

При использовании в качестве субстрата альбумина со значением pH 7.4 могут проявлять активность химотрипсин, гидролизующий белки в зоне pH 6—8 (Коновалов, 1986) и пептидил-пептидгидролазы, функционирующие при нейтральных и щелочных pH (Мосолов, 1971). В кислой зоне pH проявляют активность пепсиноподобные протеиназы — катепсины (Смит, 1986, Коновалов, 1986), активность которых, видимо, обнаруживалась при использовании субстрата гемоглобина со значениями pH 5 и 3.

При увеличении температуры инкубации ферментативно-активного препарата с различными субстратами активность всех фракций, полученных и с кишечника и с тегумента, увеличивается (табл. 2). У *E. rugosum* в этих условиях также возрастает количество фракций, способных к гидролизу белков. Увеличения количества фракций не наблюдается только при использовании в качестве субстрата гемоглобина pH 3 (табл. 1). Зависимость протеолитической активности от температуры у налима выражена сильнее, чем у *E. rugosum*. Так, при увеличении температуры инкубации с 5 до 40° протеолитическая активность у хозяина увеличивается в 3—4 раза, а у паразита в 1.5—2 раза (табл. 2). Более заметное увеличение протеолитической активности у гельминтов происходит при pH 3 (субстрат гемоглобин). При температуре инкубации 5° активность протеиназ как у налима, так и у *E. rugosum* ниже для pH 3, чем для pH 5, при 20° она примерно одинакова для обоих значений pH, а с увеличением температуры инкубации до 40° протеолитическая активность фракций со значением pH 3 выше, чем при pH 5. Это свидетельствует о большей зависимости от температуры протеиназ активных в области более кислых значений pH.

Т а б л и ц а 2

Суммарная протеолитическая активность фракций, десорбированных с пищеварительно-транспортных поверхностей кишечника налима и *E. rugosum* (мМ)

Total proteolytic activity off fractions desorbed from the digestive-absorptive surfaces of the intestine of burbot and *E. rugosum*

Температура инкубации, °С	Казеин	Альбумин	Гемоглобин	
	pH 8	pH 7.4	pH 5	pH 3
5	0.159±0.044	0.035±0.004	0.072±0.008	0.014±0.002
	0.491±0.126	0.169±0.054	0.196±0.037	0.106±0.023
	0.224±0.034	0.068±0.015	0.099±0.015	0.080±0.002
20	0.976±0.249	0.172±0.045	0.559±0.056	0.539±0.044
	0.205±0.021	0.062±0.017	0.085±0.021	0.118±0.004
40	1.695±0.362	0.718±0.0169	0.849±0.058	0.953±0.073

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 3: над чертой — паразит, под чертой — хозяин.

Т а б л и ц а 3

Общая протеолитическая активность фракций, десорбированных с пищеварительно-транспортных поверхностей кишечника налима и *E. rugosum*, в процентах от суммарной активности препаратов

Total proteolytic activity of fractions desorbed from the digestive-absorptive surfaces of the intestine of burbot and *E. rugosum* in percent of the total activity of preparations

Фракции	Казеин	Альбумин	Гемоглобин	
	pH 8	pH 7.4	pH 5	pH 3
Температура инкубации 5°				
Д ₁	69.5±8.9	62.9±12.1	64.3±0.8	43.2±6.8
	44.2±9.5	37.3±7.8	36.0±11.3	33.7±10.0
	22.9±8.2	19.0±4.7	24.2±5.7	14.0±4.9
Д ₂	18.3±6.4	20.5±5.8	21.2±0.8	11.8±1.2
	—	—	—	—
	—	—	—	—
Д ₃	16.5±3.2	17.7±4.7	17.6±4.2	19.1±1.5
	—	—	—	—
	—	—	—	—
Д ₄	10.9±3.2	5.0±2.8	8.2±3.7	10.0±2.9
	—	—	—	—
	—	—	—	—
Д ₅	4.9±1.7	2.0±1.0	5.9±2.8	7.1±3.9
	—	—	—	—
	—	—	—	—
Д ₆	4.4±1.9	1.4±0.4	2.2±1.0	4.1±2.2
	5.9±3.3	18.1±7.9	11.7±2.2	42.9±11.6
	—	—	—	—
Г	2.0±0.6	16.2±5.2	5.7±2.5	14.2±4.9
	—	—	—	—
	—	—	—	—
Температура инкубации 20°				
Д ₁	58.9±8.9	64.3±10.6	51.6±8.4	70.0±1.2
	36.4±10.9	36.3±8.0	23.6±3.0	29.6±5.8
	31.6±7.3	23.6±6.4	27.1±1.8	23.8±1.4
Д ₂	17.2±6.0	17.0±5.1	21.8±2.5	23.5±1.4
	8.8±3.8	2.8±1.8	—	—
	16.8±2.6	13.1±3.1	15.7±0.3	13.4±1.8
Д ₃	—	—	—	—
	11.1±2.0	12.2±3.3	12.9±1.0	12.5±3.7
	—	—	—	—
Д ₄	8.2±2.6	9.6±2.1	12.9±2.7	12.7±4.2
	—	—	—	—
	—	—	—	—
Д ₅	5.7±1.8	7.7±1.4	10.7±2.6	4.7±1.8
	3.2±1.1	10.3±2.8	13.6±2.1	6.3±0.8
	3.8±1.2	8.5±4.6	2.3±1.0	3.6±2.1
Г	—	—	—	—
	—	—	—	—
	—	—	—	—
Температура инкубации 40°				
Д ₁	44.4±3.2	38.2±4.9	44.1±9.7	31.4±1.0
	26.8±3.9	25.9±3.6	24.7±5.6	30.1±5.0
	37.9±1.5	35.8±4.7	32.9±0.1	20.3±1.5
Д ₂	23.8±3.1	28.5±6.7	19.0±1.7	20.6±1.4
	13.8±1.3	7.0±1.9	9.1±3.4	—
	17.3±2.3	14.6±1.4	15.8±0.7	12.3±2.5
Д ₃	3.2±0.1	3.15±1.15	3.8±0.9	—
	10.6±2.4	7.6±2.2	13.1±2.9	8.7±2.1
	—	—	—	—
Д ₄	8.2±1.6	4.7±1.3	10.7±2.2	7.9±2.1
	—	—	—	—
	—	—	—	—
Д ₅	4.6±2.2	4.8±1.2	6.9±2.7	4.2±1.3
	2.6±0.5	15.9±1.8	10.2±5.5	48.3±2.5
	7.1±2.3	13.7±5.1	9.9±0.9	16.2±3.1
Г	—	—	—	—
	—	—	—	—
	—	—	—	—

Общей закономерностью для всех используемых субстратов при всех температурах является преобладание у цестод по сравнению с кишечником (в процентном отношении от суммарной протеолитической активности всех фракций) легко десорбируемых фракций D_1 и D_2 . Так, у налима легко десорбируемые фракции ($D_1 + D_2$) составляют 45—60 % в зависимости от условий опыта, а у *E. rugosum* — около 80 % (табл. 3). Поскольку у цестод большая активность протеиназ сосредоточена в легко десорбируемых фракциях, можно предположить, что они используют для гидролиза белков и различных пептидов протеиназы хозяев.

При повышении температуры относительная активность легко десорбируемой фракции D_1 уменьшается в большей или меньшей степени в зависимости от условий опыта как у налима, так и у *E. rugosum*, однако у гельминтов это уменьшение выражено сильнее (табл. 3). Следовательно, при повышении температуры у ферментов, прочно связанных с мембранами, увеличивается способность гидролизовать белки.

Таким образом, приведенные выше данные свидетельствуют об участии протеиназ в процессах мембранного пищеварения у паразитирующих в рыбах цестод и о сходстве этих процессов у паразита и хозяина. Следует отметить, что, кроме возможности использования ферментов для гидролиза белков, о чем свидетельствуют полученные нами и другими авторами данные (Дубовская, 1973; Шишова-Касаточкина, Леутская, 1979, и др.), черви в процессе эволюции выработали устойчивость к протеиназам хозяев. Так, показано существование механизмов, обеспечивающих инактивацию трипсина и α - и β -химотрипсинов на поверхности цестод *H. diminuta* (Pappas, Read, 1972a, 1972b). Химическим и радиографическим способами доказано, что трипсин адсорбируется на поверхности *H. diminuta*, однако его адсорбция объясняет только 0.3 % инактивации трипсина в присутствии живых гельминтов, в то время как всего ингибируется 25 % фермента (Schroeder, Pappas, 1980). Возможно, присутствием ингибитора трипсина на поверхности цестод можно объяснить меньшую, по сравнению с хозяином, активность ферментов, составляющих прочно фиксированные фракции, наблюдавшуюся в наших исследованиях.

В настоящей работе показано функционирование на пищеварительно-транспортных поверхностях паразита и хозяина различных протеиназ, гидролизующих белки в широком диапазоне значений pH, большая часть которых проявляет активность в щелочной зоне pH. При этом черви обладают меньшей протеолитической активностью и меньшей адсорбционной способностью по сравнению с кишечниками их хозяев. Осуществление гидролитических процессов на поверхности тегумента дает несомненные кинетические преимущества для дальнейшего транспорта мономеров в тело паразита.

Список литературы

- Алексеев Л. Н. Определение активности протеиназ по расщеплению белковых субстратов // Современные методы в биохимии. М., 1968. Т. 2. С. 117.
- Дубовская А. Я. Исследование особенностей потребления различных белков цестодами, паразитирующими у позвоночных разных классов // Мед. паразитол. 1973. Вып. 42, № 5. С. 548—552.
- Еренская А. С. Изучение протеолитической активности лентеца широкого // Тр. ЛОГМИ 1974. Т. 107. С. 67—71.
- Коновалов Ю. Д. Свойства, локализация, роль и возможные пути регуляции активности протеиназ и аминотрансфераз в раннем онтогенезе рыб // Усп. совр. биол. 1986. Т. 101, вып. 3. С. 395—373.
- Кузьмина В. В. Применение метода последовательной десорбции α -амилазы с отрезка кишки при изучении мембранного пищеварения у рыб // Вопр. ихтиол. 1976. Т. 16, вып. 5. С. 944—946.
- Кузьмина В. В., Куперман Б. И. Сравнительная характеристика мембранного пищеварения у цестод и их хозяев — рыб // Паразитология. 1983. Т. 17, вып. 6. С. 436—442.
- Мембранный гидролиз и транспорт / под ред. Уголева А. М. Л.: Наука. 1986. 240 с.

- Мосолов В. В. Протеолитические ферменты М.: Наука, 1971. 413 с.
- Смит Л. С. Введение в физиологию рыб. Агропромиздат. 1986. 166 с.
- Шишова-Касаточкина О. А., Дубовская А. Я. (Sisova-Kasatockina O. A., Dubovskaya A. Ja. Proteinase activity in certain cestode species parasitizing vertebrates of different classes // *Acta parasitol. pol.* 1975. Vol. 23, N 35. P. 389—393.
- Шишова-Касаточкина О. А., Дубовская А. Я. Некоторые стороны белкового обмена у цестод — паразитов позвоночных различных классов // *Тр. ГЕЛАН.* 1977. Вып. 27. С. 211—221.
- Шишова-Касаточкина О. А., Леутская З. К. Биохимические аспекты взаимоотношений гельминта и хозяина. М.: Наука, 1979. 279 с.
- Ансон М. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin // *J. Gener. Phys.* 1938. Vol. 22, N 1. P. 79—83.
- Раррас Р. W., Нарциси Е. М. A comparison of membrane-bound enzymes of the isolated brush border plasma membranes of the cestodes *Hymenolepis diminuta* and *Hymenolepis microstoma* // *Parasitol.* 1982. Vol. 84, N 2. P. 391—396.
- Раррас Р. W., Рид С. Р. Trypsin inactivation by intact *Hymenolepis diminuta* // *J. of Parasitol.* 1972a. Vol. 58. P. 864—871.
- Раррас Р. W., Рид С. Р. Inactivation of α - and β -chymotrypsin by intact *Hymenolepis diminuta* (Cestoda) // *Biol. Bull.* 1972b. Vol. 143, N 3. P. 605—616.
- Шроедер Л. Л., Раррас Р. W. Trypsin adsorption by *Hymenolepis diminuta* (Cestoda) // *J. Parasitol.* 1980. Vol. 66, N 1. P. 49—52.

Институт биологии внутренних вод
им. И. Д. Папанина АН СССР,
Борок

Поступила 20.04.1989
после доработки 10.12.1990

CERTAIN CHARACTERISTICS OF PROTEIN HYDROLYSIS ON THE DIGESTIVE-ABSORPTIVE SURFACES OF THE CESTODE *E. RUGOSUM* AND INTESTINE OF ITS HOST, BURBOT

G. I. Izvekova

Key words: proteolytic activity, intestine of fish, tegument of cestodes, digestive-absorptive surface

SUMMARY

The functioning of different proteinases hydrolysing proteins in a wide pH range, most of which display activity in the alkaline zone of pH, on the digestive-absorptive surfaces of the parasite and host has been investigated. The dynamics of desorption of these proteinases from the intestine of *fisches* and tegument of cestodes has been studied. It has been shown that the worms possess less proteolytic activity and less capacity for adsorption of proteinases as compared to the intestines of their hosts. The dependence of proteolytic activity of desorbed fractions on the incubative medium temperature has been noted: with the increase in temperature the enzymes, bound closely with the membranes, increase their capacity to hydrolyse proteins. The predominance in cestodes, as compared to the intestine, of easily desorbed fractions D₁ and D₂ (in the percent ratio of the total proteolytic activity of all fractions) has been detected.